

Waktu Pemberian Asam Humat Tanah Gambut Kalimantan Sebagai Antiinflamasi Telapak Kaki Mencit Yang Diinduksi Karaginan

Rusliandi¹, Diah Wulandary Rousdy¹, Mukarlina¹

¹Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Tanjungpura, Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak
Email korespondensi: andiezy66@gmail.com

Abstrak

Peat soil is a land that is widely found on the Borneo Island. Approximately 75% of peat soil consists of soil organic matter, and 75% of soil organic matter consists of humus compounds. The purpose of this research is to know the volume of induction of lambda carrageen which can cause udem and to know the best time of giving humic acid before induction of carrageen. The study used a mice Swiss strain weighing 25-30 grams and 3 months old. The study used Randomized Block Design with treatment of humic acid 30 minutes before induction of carrageen, humic acid administration 60 minutes before induction of carrageen, humic acid administration 90 minutes before induction of carrageen and negative control. The results show that the best 1% lambda carrageen induction volume was 0.15 ml because it can cause udem in the test animal of 39.2 mm³. Best treatment of humic acid is found in the administration of humic acid 30 minutes before induction of carrageen. The highest inhibition of udem occurred in the 180th minute by 30.8%.

Keywords : antiinflammatory, humic acid, Peat soil

PENDAHULUAN

Tanah gambut merupakan jenis tanah yang banyak ditemukan di Indonesia. Luas lahan gambut di Indonesia menempati peringkat ke-4 terluas di dunia yaitu 14.905.574 hektar dan tersebar di Pulau Kalimantan, Sumatera dan Papua. Pulau Kalimantan mempunyai lahan gambut terluas kedua setelah Sumatera dengan luas 4.778.004 hektar (Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, 2011).

Sekitar 50% sampai 75% dari total tanah gambut mengandung bahan organik tanah (*soil organic matter*) dan sekitar 75% dari bahan organik tanah terdiri dari senyawa humus (Tan, 1995). Humus memiliki komposisi kimia, struktur dan gugus fungsi yang bisa berubah sesuai dengan bahan awal pembentuk, usia dan kondisi lingkungan selama proses humifikasi (Kodama *et al.*, 2007). Berdasarkan kemampuan kelarutan dalam air, humus terbagi menjadi asam humat, asam fulvat dan asam himatomelanik (Schepectin *et al.*, 2003).

Asam humat diketahui berpotensi sebagai antibakteri, antiulcerogenik, antialergi dan antitoksik (Schnepectin *et al.*, 2002). Penelitian secara *in vitro* yang telah dilakukan Kodama & Denso (2007) menggunakan konsentrasi 3% dan 6% asam humat dari humus subtropis pada mencit dapat menekan pertumbuhan sel L1210

dengan memperlambat pembentukan massa sel tumor sebesar 170 cm³ dan 100 cm³ dalam waktu 12 hari setelah sel tumor diinjeksikan.

Antiinflamasi adalah kemampuan senyawa atau obat untuk menekan derajat radang yang terjadi akibat induksi senyawa pada hewan uji. Inflamasi merupakan iritasi yang terjadi pada jaringan tubuh yang ditandai dengan adanya panas, penambahan derajat udem (pembengkakan), kemerahan, dan rasa sakit (Corwin, 2008). Model uji inflamasi akut yang menggunakan induksi karaginan. Pemberian karaginan dapat memicu pelepasan prostaglandin yang merupakan mediator inflamasi, sehingga menyebabkan udem (pembengkakan) pada hewan uji. Karaginan dapat memicu inflamasi dalam waktu 90-500 menit dan menurun pada menit selanjutnya (Vinegar *et al.*, 1976).

Dalam prosedur uji antiinflamasi pemberian obat antiinflamasi dilakukan sebelum inflamasi terjadi tujuannya adalah untuk mengetahui kemampuan senyawa uji dalam menekan udem yang terbentuk. Pemberian obat inflamasi seperti natrium diklofenak secara oral hanya 60 % obat yang akan mencapai sirkulasi sistemik dikarenakan melewati metabolisme lintas pertama. Johan (2000) melaporkan bahwa pemberian potassium humat dari batubara dengan dosis 60 mg/kg BB dan waktu pemberian 60 menit sebelum induksi karaginan dapat menghambat pembentukan udem

dari menit ke 60 sampai menit ke 300. Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian tentang waktu pemberian asam humat tanah gambut yang efektif menghambat efek antiinflamasi.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 3 bulan dari bulan Desember 2016 sampai Februari 2017. Penelitian dilakukan di Laboratorium Zoologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Tanjungpura Pontianak.

Bahan

Bahan yang digunakan adalah 7 ekor mencit jantan (*Mus musculus*) galur swiss berusia 3 bulan dengan berat 20-35 gram, pellet, karaginan lambda murni, larutan garam fisiologis, larutan merkuri, tanah gambut dengan tingkat kematangan saprik, HCl 6 M, NaOH 0,1 M, alkohol absolut, akuades.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 perlakuan yaitu pemberian asam humat 90 menit sebelum induksi karaginan, pemberian asam humat 60 menit sebelum induksi karaginan dan pemberian asam humat 30 menit sebelum induksi karaginan.

Prosedur Kerja

Pengambilan Tanah Gambut

Petak dibuat dengan ukuran 30x30 cm diatas permukaan tanah gambut, kemudian tanah diambil sampai kedalaman 80 cm dari permukaan. Tanah gambut dianalisis di Laboratorium Fisika dan Kesuburan Tanah Fakultas Pertanian Universitas Tanjungpura untuk menentukan tingkat kematangan tanah gambut. Tanah gambut yang telah diambil dibersihkan dari akar, ranting dan daun tanaman. Kemudian tanah gambut dikeringanginkan selama 3 hari dan dihaluskan dengan mortar.

Pemisahan Asam Humat dari Tanah Gambut

Pemisahan asam humat tanah gambut mengacu pada metode IHSS (2012). Tanah gambut yang telah dihaluskan ditimbang seberat 40 gram dan dilarutkan dalam 0,1 M NaOH 400 ml selama 4 jam sambil dikocok menggunakan *shaker*.

Kemudian larutan diendapkan selama 12 jam. Cairan diambil kemudian disaring beberapa kali. Filtrat ditambahkan larutan asam 6 M HCl hingga pH 2 sebanyak 1/3 volume awal. Kemudian dikocok menggunakan *shaker* dan diendapkan selama satu malam. Endapan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 3500 rpm selama 20 menit untuk memisahkan bagian asam humat (endapan) dan asam fulvat (supernatan). Sentrifugasi diulangi beberapa kali sampai pemisahan sempurna sehingga diperoleh endapan asam humat. Bagian asam humat kemudian dibuat dalam konsentrasi larutan yang telah ditentukan.

Penetapan Dosis Karaginan dan Asam Humat

Menurut Winter (1962) dalam Kelompok Kerja Ilmiah (1983) untuk melakukan induksi karaginan digunakan 0,2 ml suspensi karaginan 1% dalam NaCl 0,9%. Penetapan konsentrasi ekstraksi asam humat berdasarkan uji pendahuluan yang dilakukan pada konsentrasi 125 mg/kg BB menunjukkan peningkatan jumlah leukosit (Rousdy *et al.*, 2016).

Pembuatan Larutan NaCl 0,9%

Sebanyak 0,9 gram NaCl murni ditimbang kemudian dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 ml didalam beaker glass lalu diaduk sampai homogen.

Pembuatan Suspensi Karaginan 1%

Sebanyak 0,1 gram karaginan lambda ditimbang kemudian dilarutkan dengan 10 ml larutan NaCl 0,9% di dalam beaker glass.

Prosedur Uji Antiinflamasi

Volume induksi karaginan ditentukan melalui uji pertama yang dilakukan dengan menggunakan tiga ekor mencit yang diinduksi dengan tiga volume karaginan yaitu 0,1 ml, 0,15 ml dan 0,2 ml. Selanjutnya dilakukan uji antiinflamasi dengan menggunakan volume induksi karaginan terbaik yang dapat membentuk udem yang berarti pada kaki mencit.

Uji antiinflamasi diawali dengan memuaskan mencit selama 18 jam namun tetap diberi minum. Kemudian mencit ditimbang dan diberi tanda pada tubuh mencit untuk membedakan perlakuan. Sebelum diberi bahan uji kaki kiri mencit ditandai tepat di mata kaki kemudian kaki mencit diukur volumenya dengan plestismometer (Kelompok kerja ilmiah, 1983).

Perlakuan pertama mencit diberi bahan uji asam humat 125 mg/kg BB 90 menit sebelum diinduksi karaginan. Perlakuan kedua mencit diberi bahan uji asam humat 125 mg/kg BB 60 menit sebelum diinduksi karaginan. Perlakuan ketiga mencit diberi bahan uji asam humat 125 mg/kg BB 30 menit sebelum diinduksi karaginan. Perlakuan keempat mencit hanya diinduksi karaginan. Semua perlakuan kecuali kontrol negatif diinduksi karaginan sesuai dengan waktu yang ditentukan pada perlakuan

Volume telapak kaki mencit diukur pada menit ke- 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270 dan 300 setelah diinduksi karaginan. Pengukuran telapak kaki mencit menggunakan plestismometer. Parameter yang diukur adalah derajat udem (pembengkakan) yang terbentuk dan persentase penghambatan udem rata-rata. Persentase penghambatan udem dihitung dengan rumus (Raji, *et al.* 2002):

Persentase Penghambatan Udem Rata-rata

$$== \left\{ 1 - \frac{a-x}{b-y} \right\} \times 100\%$$

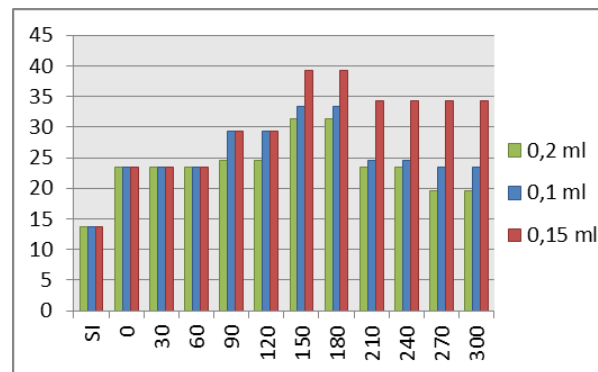
Keterangan:

- a* : volume rata-rata kaki mencit setelah diinduksi pada kelompok mencit yang diberi obat
- x* : volume rata-rata kaki mencit sebelum diinduksi pada kelompok mencit yang diberi obat
- b* : volume rata-rata kaki mencit setelah diinduksi pada kelompok mencit yang tidak diberi obat (kontrol negatif)
- y* : volume rata-rata kaki mencit sebelum diinduksi pada kelompok mencit yang tidak diberi obat (kontrol negatif)

Hasil

Penentuan volume induksi karaginan bertujuan untuk mengetahui kemampuan karaginan dalam membentuk udem yang berarti. Berdasarkan Tabel 1 semua volume karaginan lambda 1 % dapat menimbulkan udem yang berarti. Udem yang paling tinggi terbentuk pada volume induksi karaginan lambda 0,15 ml.

Penentuan waktu pemberian asam humat dalam uji antiinflamasi dilakukan untuk mengetahui kemampuan obat dalam menekan derajat udem yang terbentuk pada hewan uji. Berdasarkan Tabel 1 Penghambatan udem terjadi pada pemberian asam humat 60 menit dan 30 menit sebelum induksi karaginan. Penghambatan udem tertinggi ditunjukkan pada pemberian asam humat 30 menit sebelum induksi karaginan.



Gambar 1 Grafik udem yang terbentuk oleh karaginan lambda 1 %

Pembahasan

Uji antiinflamasi adalah uji yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan obat dalam menekan udem yang terbentuk karena senyawa induksi. Metode induksi karaginan pada kaki belakang adalah model standar percobaan inflamasi akut (Chakraborty *et al.*, 2004). Berdasarkan uji pertama, induksi karaginan dengan volume injeksi 0,15 ml mampu menghasilkan udem tertinggi pada menit ke-180 yaitu 39,2 mm³ (Tabel 1). Puncak udem tertinggi tiga perlakuan terjadi pada menit ke-180. Morris (2003) menyatakan udem berkembang cepat setelah 3 jam induksi karaginan dan tetap bertahan hingga 5 jam. Menurut Winter (1962) dalam Kelompok Kerja Ilmiah (1983) 0,2 ml karaginan 1% sudah dapat membentuk udem yang berarti pada hewan uji.

Uji antiinflamasi pada penelitian menggunakan induksi karaginan. Karaginan merupakan turunan polisakarida yang akan dikenal tubuh sebagai substansi asing sehingga mampu menyebabkan udem. Karaginan akan menyebabkan fosfolipid membran sel rusak dan menghasilkan asam arakhidonat dengan bantuan enzim fosfolipase. Selanjutnya asam arakhidonat akan memasuki jalur lipooksigenase dan siklooksigenase untuk membentuk mediator inflamasi (leukotrien, prostaglandin dan tromboksan. Induksi karaginan dilakukan secara subplantar pada telapak kaki mencit. Induksi karaginan secara subplantar dapat meningkatkan kadar siklooksigenase-2 (COX-2) yang akan dihambat oleh obat antiinflamasi (Turnbach, *et al.*, 2002).

Variasi waktu pemberian asam humat dapat menentukan kemampuan antiinflamasi asam humat dosis 125 mg/kg BB. Berdasarkan Tabel 1 waktu pemberian asam humat 90 menit menunjukkan kemampuan antiinflamasi asam humat tanah gambut. Berdasarkan penelitian

terdahulu penggunaan potassium humat yang berasal dari batubara untuk uji antiinflamasi pada

tikus diberikan 60 menit pada tikus sebelum induksi karaginan dilakukan (Johan, 2000)

Tabel 1 Persentase penghambatan udem pada variasi waktu pemberian asam humat dosis 125 mg/kg BB

Perlakuan	Menit Setelah Induksi										
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300
90'	0	0	-40,2	-37,4	-37,4	-3,8	-3,8	-23,8	-23,8	-4,7	-4,7
60'	0	0	-40,2	12,6	12,6	15,3	15,3	4,7	4,7	4,7	4,7
30'	0	0	0	12,6	12,6	30,7	30,7	23,7	23,7	23,7	33,3

Keterangan: '90: pemberian asam humat 90 menit sebelum induksi karaginan; '60: pemberian asam humat 60 menit sebelum induksi karaginan; '30: pemberian asam humat 30 menit sebelum induksi karaginan

Berdasarkan Tabel 1 persentase penghambatan udem tertinggi pada perlakuan pemberian asam humat 60 menit dan 30 menit sebelum induksi karaginan. Penghambatan udem tertinggi terjadi pada menit ke 180 sebesar 15,3 mm³ dan 30,7 mm³. Menurut Johan (2000), puncak udem terjadi di menit ke-180 sampai dengan menit 240 pada pemberian potassium humat 60 menit sebelum induksi karaginan.

Pada penelitian ini pemberian asam humat 30 menit sebelum induksi karaginan menunjukkan efek antiinflamasi terbaik dibandingkan dua perlakuan lainnya. Dosis yang lebih tinggi mempunyai waktu kerja lebih singkat dibandingkan dosis yang lebih rendah. Johan (2000) melaporkan bahwa pada pemberian potasium humat 60 menit sebelum induksi karaginan dengan dosis 60 mg/kg BB pada tikus memiliki penghambatan udem terbaik di menit 180 sampai dengan menit ke-240.

Asam humat diketahui memiliki kemampuan antiinflamasi karena dapat meningkatkan proliferasi limfosit dan meningkatkan produksi interleukin 2 (IL-2) yang berfungsi untuk menstimulasi perkembangan sel NK (*natural killer*) dan mensintesis antibodi (Joone *et al.*, 2003). Menurut Rousdy *et al.*, (2016) pemberian asam humat tergantung dari dosis, dosis asam humat 250 mg/kg BB menurunkan jumlah neutrofil dan monosit yang berperan dalam proses inflamasi.

Obat antiinflamasi umumnya akan diabsorpsi cepat setelah pemberian secara oral. Salah satu obat antiinflamasi yang umum digunakan adalah natrium diklofenak. Natrium diklofenak akan diabsorpsi dengan sempurna bila diberikan secara oral dan selanjutnya mengalami metabolisme lintas pertama dan hanya 60% obat yang akan sampai pada sistem peredaran darah. Natrium diklofenak akan mulai bekerja dengan efektif setelah 30-60 menit setelah diberikan secara oral

dan waktu paruh obat ini adalah 1-2 jam (Tan dan Rahardja 2000 *dalam* Rahman *et al.*, 2007).

Waktu terbaik pemberian asam humat terjadi pada 30 menit sebelum induksi karaginan hal ini menunjukkan bahwa asam humat cepat diabsorpsi dan dimetabolisme tubuh namun belum diketahui waktu paruh dari asam humat sebagai senyawa antiinflamasi. Natrium diklofenak adalah obat antiinflamasi yang memiliki waktu paruh yang pendek. Setelah waktu paruh obat terlewati maka natrium diklofenak akan segera diekskresikan dari tubuh. (Tan dan Rahardja 2000 *dalam* Rahman *et al.*, 2007).

DAFTAR PUSTAKA

- Badan penelitian dan pengembangan pertanian, 2011, *Peta Lahan Gambut Indonesia Skala 1:250.000*, Kementerian Pertanian, Cimanggu, Bogor.
- Chakraborty A, Devi RKB, Rita S, Sharatchandra KH, and Th. I. Singh, 2004, Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models, *Indian Journal Pharmacology* Vol.36 No.3, Hal: 148-150.
- Corwin E, 2008, *Handbook of pathophysiology* 3rd edition, Philadelphia lippincott Williams and Wilkin 138-143.
- International Humic Substances Society, 2012, Isolation of IHSS Soil Fulvic and HumicAcids, http://www.humicsubstances.org/documents/OI_d/%20IHSS%20Newsletter.
- Johan PNW, 2000, An evaluation of the anti-inflammatory properties of a brown coal derived potassium humate, *Disertasi*, University of Pretoria.
- Joone GK, Dekker J and Jansen van Rensburg CE, 2003, Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate, *Z Naturforsch* Vol.58 hal:263-267.

- Kelompok Kerja Ilmiah, 1983, *Penapisan Farmakologi, Pengujian Fitokimia dan Pengujian Klinik, Pedoman Pengujian dan Perkembangan Fitofarmaka*, Pengembangan dan Pemanfaatan Obat Alam, Jakarta: Yayasan Pengembangan Obat Bahan Alam, Ohyto Medica, 43-45.
- Kodama, H, & Denso, 2007, Antitumor Effect of Humus Extract on Murine Transplantable L1210 Leukemia, *Jurnal Vet. Med. Sci.* Vol 69. No 10. Hal. 1069-1071.
- Kodama H, Denso & Tsuyoshi N, 2007, Protection Against Atypical *Aeromonas salmonicida* Infection in Carp (*Cyprinus carpio* L.) by Oral Administration of Humus Ekstrak, *Jurnal Vet. Med. Sci.* Vol 69. No.4 hal. 405-408.
- Morris CJ, 2003, Carrageenan Induced Paw Oedema in the Rat and Mouse in P.G Winyard dan DA. Willoughby (Ed). *Methods in Molecular Biology, Inflammations Protocol*, Vol.225 Hal:115-121
- Raji, Udoh US, Oluwadara OO, Akinsomisoye OS, Awobajo O, dan Adhesoga K, 2002, Anti-inflammatory and Analgesic Properties of the Rhizome Ekstrak of *Zingiber officinale*, *African Journal of Biomedical Research*, Vol.5 Hal.121-124
- Rahman L, Aliyah P, dan Abdul MR, 2007, Profil farmakokinetik mikrokapsul Natrium Diklofenak yang disaut dengan Karboksimetilsellulosa-Aluminium Sulfat Pada Kelinci, *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, Vol 11, No 2 Hal:13
- Rousdy, DW , Rahmawati, dan Kurniatuhadi K, 2016, Immune Responses Of Wistar Rat (*Rattus norvegicus*) on Addition of Humic Acid From Borneo Peat Soil, *Biosaintifika*, Vol. 8 No. 3 Hal. 400-405.
- Schepetkin, IA, Khlebnikov, AI, Ah, S.Y., Woo, SB, Jeong, CS, Klubachuk ON, dan Kwon BS, 2003, Characterization and Biological Activities of Humic Substances from Mumie. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. Vol. 51 No.1 hal: 5245-5254.
- Schepetkin, IA, Khlebnikov, AI, dan Kwon BS, 2002, Medical Drugs from Humus Matter: Focus on Mumie, *Drug Dev*, Vol. 57 hal. 140-159
- Tan, KH, 1995, *Dasar-dasar Kimia Tanah*, Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Turnbach ME, DS Spraggins, dan A Randich, 2002, Spinal administration of prostaglandin E2 or prostaglandin F2 α primarily produces mechanical hyperalgesia that is mediated by nociceptive specific spinal dorsal horn neuron. *Pain* vol.97 Hal: 33-45.
- Vinegar,R., Truax JL, dan Selph JL, 1976, *Quantitive Studies of The Pathway to Acute Carrageenan Inflammation*. Federation Proceefing.